

DŁUGIE ŻYCIE NEUTROFIŁA? KONTROWERSJE DOTYCZĄCE DŁUGOŚCI ŻYCIA NEUTROFIŁI W KRAŻENIU

**“LONG LIVE” THE NEUTROPHIL?
CONTROVERSY OVER LIFE SPAN OF NEUTROPHILS IN CIRCULATION**

**Iwona CICHON^{*}, Michał SANTOCKI^{*},
Katarzyna WIERZBICKA, Elżbieta KOŁACZKOWSKA**

**Zakład Immunologii Ewolucyjnej, Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych,
Uniwersytet Jagielloński, Kraków**

Streszczenie: Do niedawna neutrofile uważane były za komórki pierwszej linii obrony, o prostym, niezróżnicowanym fenotypie, krótkim czasie życia i prostych prozapalnych funkcjach związanych głównie z fagocytozą. Badania przeprowadzone w ostatnich latach zweryfikowały ten pogląd. Dowiedziono istnienia różnych populacji/fenotypów neutrofilii, opisano nowe mechanizmy eliminacji patogenów przez te komórki, wykazano zaangażowanie neutrofilii w odpowiedź nabytą, a także wykazano, że czas ich życia jest plastyczny. Obecne opracowanie zostanie poświęcone temu ostatniemu zjawisku poprzez prześledzenie losów neutrofilii od ich powstania do śmierci. Szczególnie interesującym wydaje się tocząca się dyskusja naukowa jaka dotyczy określenia czasu przebywania neutrofilii w krążeniu, przed ich usunięciem z krwi. W niniejszym opracowaniu uwzględniono wszystkie założenia badań dotyczących długości życia neutrofilii, w tym modele matematyczne, oraz opisano zarzuty i kontrargumenty wszystkich zaangażowanych w polemikę stron. Podjęto także dyskusję nad znaczeniem długości życia neutrofilii, w tym konsekwencjami tego faktu dla funkcji obronnych organizmu. Ponadto odniesiono się do najnowszych doniesień dotyczących zaangażowania w funkcje obronne starzejących się neutrofilii, które w warunkach homeostazy zostałyby usunięte z organizmu. W ciągu ostatniej dekady neutrofile były przedmiotem intensywnych badań, które przyniosły przełomowe odkrycia dotyczące tych komórek, stawiając je w nowym świetle w kontekście kompleksowej odpowiedzi immunologicznej, a Autorzy niniejszego opracowania postawili sobie za cel przybliżenie niektórych z nich.

Słowa kluczowe: neutrofile, dojrzewanie neutrofilii, czas półtrwania, krew, zapalenie

^{*} Autorzy o takim samym wkładzie pracy w publikację

Summary: Until recently neutrophils were considered simple foot soldiers of the innate immune system, phenotypically uniformed, short-lived and with unsophisticated repertoire of pro-inflammatory functions mostly connected with a process of phagocytosis. Studies published during last years revealed that in fact there are diverse populations/phenotypes of neutrophils and the cells can kill pathogens by multiple means. Moreover, they can initiate/participate in adaptive immunity, and their life span is adaptable and probably longer than believed. Herein, the latter phenomenon is foremost described and discussed, and the neutrophil life is followed from its rise in the bone marrow up till its death. Special attention is paid to the ongoing scientific dispute focusing on neutrophil half-life in circulation. The current article reviews all hypothesis and solid data on neutrophil life span, as well as mathematical models, which were used in the discussion. Arguments and counterarguments of all involved research groups are debated. The significance of neutrophil (longer) life span is further discussed as well as its consequences for immunity, particularly in the light of data on involvement of aged neutrophils in immune responses.

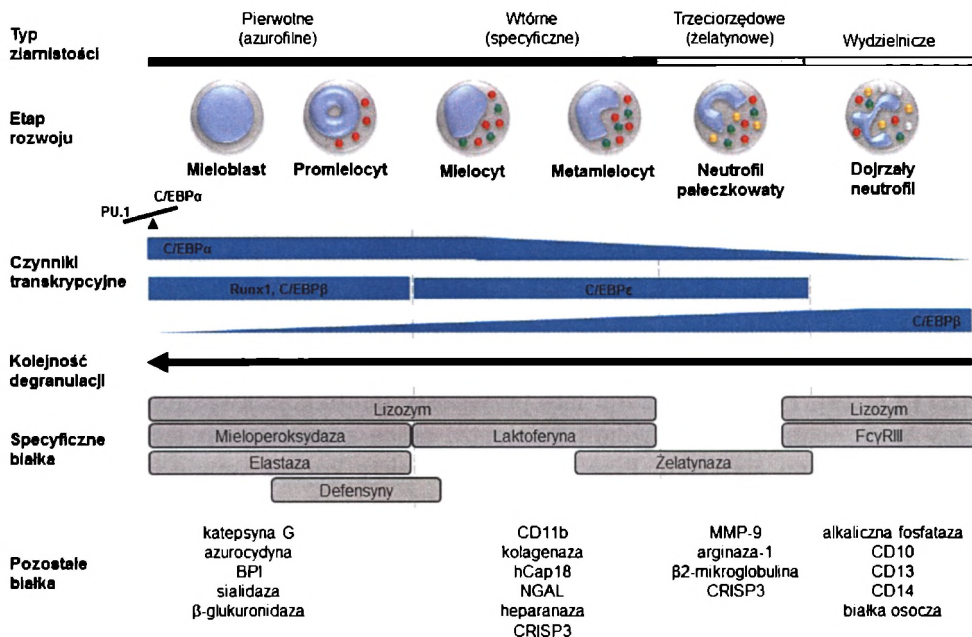
Over the last decade several new facts were revealed about neutrophils which changed our perception of these cells. Herein not only did we name them but we described some of them in detail, in the context of ongoing scientific discussions.

Key words: neutrophils, neutrophils maturation, half-life, blood, inflammation

WSTĘP

Leukocyty, posiadające zdolność przemieszczania się komórki układu odpornościowego, stanowią jedną z najliczniejszych grup komórek w całym organizmie, a ich liczba u zdrowego dorosłego człowieka wynosi pomiędzy $4 \text{ a } 10 \times 10^9$ w jednym litrze krwi [12, 48]. Leukocyty obecne są we krwi, jak również w narządach immunokompetentnych, mogą także zasiedlać zdrowe tkanki [51]. To właśnie te ostatnie komórki stanowią pierwszą linię aktywnej obrony immunologicznej po wnikięciu do organizmu patogenów. Komórki te mają za zadanie albo wyłapywanie patogenów z obszarów organizmu bezpośrednio narażonych na kontakt ze środowiskiem zewnętrznym (np. w skórze) lub patrolują krew przebywając w naczyniach krwionośnych (np. sinusoid wątroby, kapilar płucnych) gdzie pozostają w kontakcie ze śródbłonkiem. Ostatnio coraz częściej dostrzega się, że wśród leukocytów patrolujących narządy w stanie homeostazy obecne są także neutrofile [23, 24, 44], co jest zaprzeczeniem dotychczas obowiązującego dogmatu, zgodnie z którym neutrofile nie są obecne w zdrowych tkankach. Neutrofile te mogą także stanowić pulę marginalną tj. populację komórek, która nie krąży we krwi, a jest do niej rekrutowana (traci kontakt ze śródbłonkiem naczyńniowym) dopiero po zaistnieniu sytuacji stresowej, w tym zapalenia [24].

Dojrzałe neutrofile charakteryzuje obecność w cytoplazmie licznych ziarnistości kilku typów oraz segmentowane jądro komórkowe, stąd ich synonimiczna nazwa – komórki polimorfonuklearne (PMN) [47]. Ziarnistości azurofilne (pierwotne) zawierają proteazy serynowe takie jak elastaza, katepsyna G, proteinaza 3 oraz α -defensyny, lizozym, czy mieloperoksydaza (MPO) [1, 3, 10, 17, 22, 25, 38] (ryc. 1).



RYCINA 1. Etapy dojrzewania neutrofilów, typy i skład ziarnistości neutrofilowych. Na rycinie zaznaczono działanie specyficznych czynników transkrypcyjnych, kolejność powstawania poszczególnych typów ziarnistości, a także zaznaczono na jakim etapie dojrzewania neutrofilów oraz w których ziarnistościach, powstają poszczególne białka. Wśród tych ostatnich podkreślono białka specyficzne dla danego typu ziarnistości. Czynniki transkrypcyjne: (i) C/EBPα (ang. *CCAAT Enhancer Binding Proteins*) – białka wiążące się z sekwencją aminokwasową CCAAT, (ii) PU.1 i (iii) Runx1. Wysoka ekspresja PU.1 prowadzi do różnicowania się komórek prekursorowych w kierunku monocytów, podczas gdy obecność C/EBPα jest niezbędna do wkroczenia komórki na drogę granulocytopoezy [4, 5]. Runx1 oraz C/EBPβ są wymagane w trakcie syntezy MPO oraz elastazy. C/EBPε warunkuje tworzenie ziaren wtórnych oraz ziaren trzeciorzędowych [18]. Na podstawie [1, 17] (zmodyfikowano)

FIGURE 1. Stages of neutrophil maturation, types and content of neutrophil granules. Expression and activity of specific transcription factors is marked on the graph. Sequential appearance of neutrophil granules and their maturation stage-dependent characteristic proteins are also indicated. The appearance of granule specific proteins is underlined. Transcription factors: (i) C/EBPα (*CCAAT Enhancer Binding Proteins*), (ii) PU.1 and (iii) Runx1. High expression of PU.1 favors differentiation into monocytes, and C/EBPα into granulocytes [4, 5]. Runx1 and C/EBPβ are required for synthesis of MPO and elastase. C/EBPε controls formation of secondary and tertiary granules [18]. Based on [1, 17] (modified)

W skład ziarnistości drugorzędowych (wtórnych) wchodzi laktoferyna, lipokalina neutrofilowa związana z żelatynazą (ang. *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*, NGAL), hCAP-18, kolagenaza, heparinaza czy lizozym [1, 6]. Natomiast ziarnistości trzeciorzędowe zostały sklasyfikowane na podstawie obecności enzymu żelatynazy B, zwanej także metaloproteinazą macierzy zewnątrzkomórkowej 9 (MMP-9)

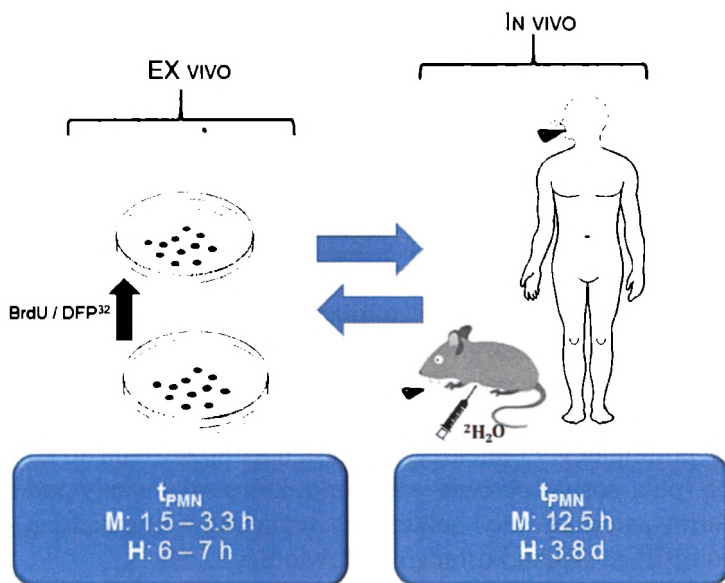
[5, 18]. Sądzi się, że obecność różnych typów ziarnistości neutrofilowych, które pojawiają się kolejno w czasie dojrzewania komórki wynika z faktu, że niektóre białka nie mogą razem występować, gdyż powodują wzajemną degradację, na przykład elastaza neutrofilowa trawi NGAL [5]. Etapy dojrzewania neutrofilii [5], aktywność odpowiedzialnych za nie czynników transkrypcyjnych [4] oraz typy ziarnistości neutrofili, ich zawartość i kolejność powstawania [6] zostały przedstawione na rycinie 1.

Biologia neutrofilii jest obecnie obszarem dużego zainteresowania fizjologów, w tym hematologów i immunologów, ze względu na liczne nowe odkrycia dotyczące biologii tych komórek. Na przykład, niewiele ponad dekadę temu odkryto kolejny mechanizm poprzez który neutrofile mogą zabijać patogeny, tzw. zewnątrzkomórkowe sieci neutrofilowe (ang. *Neutrophil Extracellular Traps*, NET) [7, 24]. Ponadto ostatnie lata przyniosły publikacje kwestionujące krótki czas życia neutrofilii w krążeniu. Niniejsza praca zostanie poświęcona głównie temu ostatniemu zjawisku. Przedyskutujemy także konsekwencje jakie długość życia tych komórek może mieć dla układu odpornościowego, w tym dla rozwoju chorób nowotworowych. Jest to istotne ze względu na funkcje bójcze i cytotoksyczne tych komórek, a także z uwagi na fakt, że neutrofile są najliczniejszymi leukocytami krwi u człowieka [51].

DLUGOŚĆ ŻYCIA NEUTROFILI W KRĄŻENIU

Długość życia neutrofili w krążeniu, oraz ich zależne od wieku zaangażowanie w proces zapalny, stanowi obecnie obiekt zainteresowania wielu grup badawczych i w ostatnich latach wzbudziły wiele kontrowersji. Dotychczasowe hipotezy opierały się na badaniach *in vitro* (strategii opartej na pozyskaniu i inkubacji neutrofili poza organizmem) oraz *ex vivo* (na komórkach wyizolowanych z krwi ludzkiej, bądź mysiej, i hodowanych poza ustrojem, a następnie ponownie przeniesionych do organizmu gospodarza), które szacowały okres półtrwania (czas, w którym dochodzi do eliminacji połowy komórek krążących w ustroju) neutrofili na od 6 do 10 godzin u człowieka [14, 32, 34] oraz od 1.5 [34, 42] do 3.3 godzin u myszy [41]. Krótki czas życia neutrofili krążących we krwi, w stosunku do innych leukocytów, nie budził dotąd zastrzeżeń badaczy. Uznawano, iż wynika to z faktu, że komórki te, choć wysoce skuteczne w obronie przeciwko patogenom, są także potencjalnie niebezpieczne wobec własnych tkanek [24]. Dotychczas uważano zatem, iż aby zminimalizować możliwe szkodliwe działanie neutrofili w stosunku do zdrowych tkanek i narządów, nie pozostają one w krążeniu dłużej niż kilka, kilkanaście godzin [24, 40]. Grupa Prof. Leo Koenderman'a z Holandii (Uniwersytet w Utrechcie) uznała, że istnieje konieczność weryfikacji dotychczasowych danych, gdyż wadą badań *ex vivo* są ograniczone możliwości odtworzenia w całości warunków panujących *in*

vivo, a ponadto, aktywacja neutrofili podczas manipulacji dokonywanych poza organizmem może prowadzić do retencji neutrofili w płucach, wątrobie, śledzionie i szpiku kostnym, ograniczając ich czas przebywania w krążeniu [42]. Wykazano to na przykładzie neutrofili myszy, z których 90 % po przeniesieniu z warunków *ex vivo* ponownie do krążenia została usunięta z krwi w ciągu 4 godzin [41]. Dlatego grupa Prof. Koenderman'a zastosowała nowe podejście badawcze do weryfikacji dotychczasowych danych [34]. Badacze Ci opierając się na znakowaniu neutrofili *in vivo*, a następnie analizie uzyskanych wyników przy pomocy modelu matematycznego, oszacowali czas półtrwania neutrofili u człowieka na 3.8 dnia, natomiast komórek myszy na 12.5 godzin [34]. Badania te zostały przeprowadzo-



RYCINA 2. Porównanie metodologii znakowania oraz szacowanej długości półtrwania neutrofili myszy i człowieka. Po lewej stronie przedstawiono dotychczasowe podejście badawcze opierające się na znakowaniu neutrofili *ex vivo* syntetycznym analogiem tymidyny (5-bromo-2-deoksyurydyny, BrdU) [32] lub radioizotopem diizopropylfluorofosforanu (DFP³²) [14]. Po prawej stronie przedstawiono najnowsze podejście badawcze oparte na dostarczeniu ciężkiej wody (²H₂O) wprost do organizmu i wyznakowaniu neutrofili bezpośrednio w organizmie. t_{PMN} , czas półtrwania neutrofili we krwi obwodowej podany w godzinach [h] lub w dniach [d]; dane dla myszy (M) oraz człowieka (H); na podstawie [34]

FIGURE 2. Comparison of methodology applied to label and evaluate half-life of neutrophils in mice and humans. On the left hand side, the previously applied methods are named which were based on *ex vivo* neutrophil labelling with an analog of thymidine (bromodeoxyuridine, BrdU) [32] or diisopropylphosphorofluoridate (DFP³²) [14]. On the right hand side, the up-to-date methods are showed. They are based on administration of deuterium (²H₂O) directly to the animal/human body to label neutrophils *in situ*. t_{PMN} , half-life of neutrophils in peripheral blood in hours [h] or days [d]; data for mice (M) and humans (H); based on [34]

ne z użyciem znakowanej izotopowo wody ciężkiej – $^2\text{H}_2\text{O}$, w której pojedynczy atom wodoru został zastąpiony przez deuter (^2H) [34] (ryc. 2).

Znakowanie stabilnym izotopem wodoru – deuterem, jest relatywnie nową metodą, która pozwala na oznaczenie odpowiedniej populacji komórek, bez cytotoksycznego efektu znacznika [42]. ^2H może być podany doustnie w postaci wody ciężkiej ($^2\text{H}_2\text{O}$) lub wyznakowanej glukozy ([6,6- $^2\text{H}_2$]D-glukozy), która jest używana do syntezy nukleotydów *de novo*, a zatem wbudowywana podczas syntezy DNA do dzielących się komórek. Inkorporacja izotopu do DNA może być następnie oszacowana przez zastosowanie metod chromatografii gazowej i spektrometrii masowej [42].

MODEL MATEMATYCZNY WYKORZYSTANY DO OSZACOWANIA DŁUGOŚCI ŻYCIA NEUTROFIŁI

Grupa Prof. Leo Koenderman'a swoje analizy oparła na autorskim modelu matematycznym, dzięki któremu naukowcy powiązali stężenie wyznakowanej izotopowo wody obecnej w moczu i we krwi z długością życia neutrofilii [34] (ryc. 3A). Przeciętna długość życia neutrofilii została oszacowana jako odwrotność całkowitego obrotu tych komórek w organizmie, od powstania w szpiku do usunięcia z krwiobiegu ($1/d$). Natomiast czas półtrwania neutrofilii został zdefiniowany jako iloraz logarytmu naturalnego i całkowitego obrotu komórek w ustroju ($\ln 2/d$). Kinetyka neutrofilii scharakteryzowana została na podstawie tempa podziałów mitotycznych w szpiku kostnym (pula mitotyczna – komórki proliferujące: promielocyty i mielocyty), czasu ich dojrzewania do komórek postmitotycznych (pula postmitotyczna – komórki, które zakończyły podziały: metamielocyty, formy pałeczkowate i neutrofile z segmentowanym jądrem) oraz czasu przejścia neutrofilii ze szpiku kostnego do krwiobiegu [34].

Do badań nad długością życia neutrofilii zaproszono pięciu zdrowych ochotników (mężczyzn), a także wykorzystano myszy szczepu wsobnego C57BL/6J [34] (ryc. 2). Ochotnicy otrzymali początkową dawkę 10 ml wody ciężkiej na kilogram wody ciała, w małych porcjach, w czasie pierwszego dnia. Całkowita objętość wody obecnej w organizmie została oszacowana na podstawie założenia, iż stanowi ona 60 % całkowitej masy ciała. Aby podtrzymać dawkę, ochotnicy pili 1/8 początkowej objętości wody dziennie przez okres 9 tygodni (63 dni). Ich krew oraz mocz zostały pozyskane przed znakowaniem, po przyjęciu dawki początkowej w dniu 0, sześć razy podczas zastosowanego protokołu znakowania oraz dodatkowo siedem razy po etapie podawania znacznika. Z kolei myszy otrzymały początkową dawkę wody ciężkiej poprzez iniekcję dootrzewnową, po czym podawano im 4% $^2\text{H}_2\text{O}$ z wodą pitną przez okres 1 tygodnia [34].

W zastosowanym modelu dokonano korekty frakcji wody ciężkiej w stosunku do całkowitej zawartości wody w ciele, poprzez porównanie poziomu wzbogacenia deuterem moczu (u ludzi) oraz osocza (u myszy), przed i po czasie znakowania (ryc. 3Ai), a w następnej kolejności dokonano pomiaru poziomu wzbogacenia deuterem DNA neutrofilów (ryc. 3Aii).

A. Modele grupy Leo Koendermana [34]

AI. Równania korygujące frakcję wody ciężkiej względem całkowitej zawartości wody w organizmie

$$U(t) = f(1 - e^{-\delta t}) + \beta e^{-\delta t} \text{ podczas znakowania } (t \leq \tau) \\ U(t) = [f(1 - e^{-\delta \tau}) + \beta e^{-\delta \tau}] e^{-\delta(t-\tau)} \text{ po czasie znakowania } (t > \tau)$$

$U(t)$ – frakcja wody ciężkiej w moczu lub osoczu w czasie t (w dniach), f – frakcja znakowanej wody ciężkiej w wodzie spożywanej, δ – obrót wody w organizmie w ciągu doby, β – wyjściowy poziom znakowanej wody w ciele po podaniu początkowej dawki wody ciężkiej, oznaczony pod koniec dnia 0, τ – dzień zaprzestania znakowania u ludzi ($\tau = 63$ dzień) i u myszy ($\tau = 7$ dzień).

AII. Równanie wzbogacenia DNA neutrofilów deuterem

$$dL(t)/dt = dcU(t-\Delta) - dL(t)$$

d – przeciętny czas obrotu (ang. *cell turnover*) neutrofilów w organizmie, tj. pełny cykl życia od powstania komórki do jej usunięcia, $L(t)$ – frakcja wyznakowanego DNA w czasie t (w dniach), c – czynnik amplifikacji, $U(t-\Delta)$ – wzbogacenie wody obecnej w organizmie o wodę ciężką, Δ – czas opóźnienia pomiędzy produkcją neutrofilów w puli mitotycznej w szpiku kostnym, a pomiarem wyznakowanego DNA w puli postmitotycznej i we krwi.

B. Model grupy Michaela Peters'a [45]

$$\text{wzbogacenie krwi } (t) = a \cdot [\text{krzywa wzbogacenia moczu } (t-b)]$$

a – czynnik skalujący dla różnego wbudowywania znacznika w DNA oznaczanego w moczu oraz krwi, b – interwał czasowy (opóźnienie) między krzywymi wzbogacenia DNA w deuter.

C. Model grupy Dereka Macallana [28]

$$dN_p(t)/dt = z \cdot R \cdot U(t) \cdot b_{wg} - z \cdot R \cdot L_p(t) \\ dN_p(t)/dt = z \cdot L_p(t - \Delta) - z \cdot L_b(t)$$

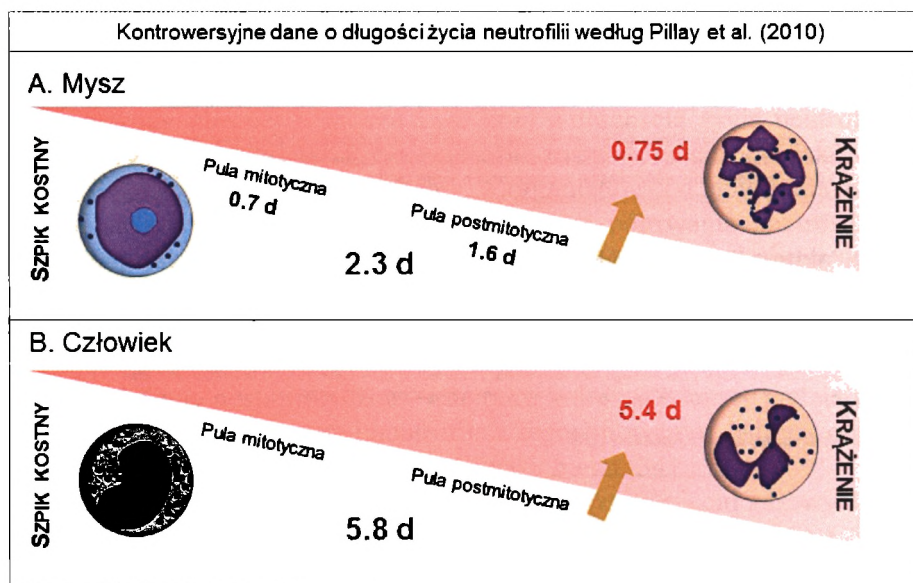
N_p – liczba neutrofilów proliferujących w szpiku kostnym, z – szybkość opuszczania krwi przez neutrofile, R – stosunek neutrofilów obecnych we krwi do ich prekursorów (w puli mitotycznej) obecnych w szpiku, $U(t)$ – wbudowanie znacznika w DNA w czasie t , b_{wg} – czynnik normalizacji wody lub glukozy (w zależności od użytego znacznika), L – frakcja neutrofilów w puli proliferującej w szpiku (L_p) i we krwi (L_b), Δ – czas przejścia neutrofilów ze szpiku do krążenia.

RYCINA 3. Wzory matematyczne modeli opracowanych w badaniach nad określeniem całkowitej długości życia oraz czasu półtrwania neutrofilów we krwi obwodowej. A. Modele grupy Leo Koenderman'a, B. Model grupy Michaela Peters'a, C. Model grupy Dereka Macallana'a; na podstawie [28, 34, 45]
FIGURE 3. Mathematical formulas applied in studies on total neutrophil life span as well as half-life of neutrophils in circulation. A. models of Leo Koenderman's group, B. the model of Michael Peters group, C. the model of Derek Macellan's group; based on [28, 34, 45]

Opracowany model matematyczny opierał się na następujących założeniach:

- (i) neutrofile to kinetycznie jednorodna populacja, co oznacza, że średnia liczba nowopowstających neutrofilów równa jest liczbie znakowanych komórek, które są usuwane z ustroju,
- (ii) nowopowstające neutrofile trafiają do krwi z czasem opóźnienia Δ [dni]. Czas ten zazwyczaj wynosi od 6 do 7 dni [14, 30].

Zatem w modelu matematycznym grupy Prof. Koenderman'a przyjęto kinetyczną homogenność populacji neutrofilów w warunkach homeostazy [34]. Z uwagi na to, iż niewiele prac wskazuje na recyrkulację neutrofilii w warunkach homeostazy [9], a podany procent, który mógłby ewentualnie podlegać ponownemu wejściu do krążenia jest znikomy, autorzy przyjęli, iż recyrkulacja neutrofilów nie zaburza weryfikacji czasu życia tych komórek (ryc. 3Aii) [34]. Jednak założenie homogenności populacji nie było w pełni poprawne, do czego po latach odnieśli się sami badacze.



RYCINA 4. Długość życia neutrofilów myszy (A) oraz człowieka (B) w szpiku kostnym oraz we krwi obwodowej zaproponowana przez grupę Leo Koendermana. Na schemacie zaznaczono na czerwono długość życia neutrofilów – w krążeniu, na niebiesko – w szpiku kostnym. Pula mitotyczna – komórki proliferujące, pula postmitotyczna – niedojrzałe neutrofile, które zakończyły już podziały. Strzałką oznaczono przejście neutrofilów ze szpiku do krwi obwodowej. Dane na podstawie modelu matematycznego opracowanego przez Pillay i wsp. (2010) [34]

FIGURE 4. Life span of neutrophils in bone marrow and blood in mice (A) and humans (B) estimated by Leo Koenderman's group. The life span of neutrophils in circulation is labeled in red, and in bone marrow in blue. The mitotic pool – proliferating cells, the postmitotic pool – immature cells which have already stopped proliferating. The arrow points transition from bone marrow to peripheral blood. Based on a mathematical model by Pillay et al. (2010) [34]

W pierwszej kolejności porównano dynamikę przebywania neutrofilii myszy w szpiku kostnym oraz we krwi. Czas dojrzewania neutrofilii w szpiku kostnym, zdolnych do proliferacji w puli mitotycznej oszacowano na 0.7 dnia, natomiast czas przebywania komórek w puli postmitotycznej na 1.6 dnia (ryc. 4). Sumarycznie uzyskany czas opóźnienia przejścia neutrofilii ze szpiku do krwi (2.3 dni) został określony przy pomocy modelu matematycznego przedstawionego na rycinie 3Aii. Przeciętny okres półtrwania krążących we krwi neutrofilii myszy został oszacowany na 12.5 h, co ostatecznie korespondowało z uzyskanym w równaniu całkowitym czasem życia w krążeniu wynoszącym 0.75 dnia (ryc. 3Aii, ryc. 4) [34].

W dalszej kolejności ocenie poddano dynamikę życia ludzkich neutrofilii. Przeciętny czas półtrwania neutrofilii w krwiobiegu oceniono na 3.8 dnia (91.2 h), co odpowiadało wyliczonej na podstawie modelu matematycznego długości życia we krwi 5.4 dnia (129.6 h) i opóźnionemu wyjściu ze szpiku kostnego – 5.8 dnia (139.2 h) (ryc. 3Aii, ryc. 4) [34]. Sumarycznie całkowita długość życia neutrofilii człowieka wynosiłaby zatem 11.2 dnia (268.8 h), a szacowany czas opóźnienia wejścia neutrofilii do krwiobiegu okazał się w przybliżeniu zgodny z czasem przejścia tych komórek przez pulę postmitotyczną – od 6 do 7 dni. Czas ten oszacowano w badaniach, w których do znakowania ludzkich neutrofilii zastosowano trytowaną tymidynę oraz znakowaną deuterem glukozę [14, 30]. Wyniki te wskazywały zatem, że czas przebywania neutrofilii we krwi był ponad 10 razy dłuższy od dotychczas opublikowanych danych [11].

KONTROWERSJE DOTYCZĄCE ZASTOSOWANEGO MODELU MATEMATYCZNEGO

Uzyskane wyniki przede wszystkim zakwestionowały przyjęty dotychczas pogląd na temat długości życia ludzkich neutrofilii w krążeniu. Zatem nie jest zaskakującym, że to przełomowe doniesienie spotkało się ze sceptycznym nastawieniem ze strony niektórych badaczy. W szczególności praca Pillay'a i wsp. (2010) napotkała na konstruktywną krytykę ze strony Prof. Michaela Peters'a z Uniwersytetu w Sussex (Wielka Brytania) [45], Prof. Davida Dale'a z Uniwersytetu w Waszyngtonie (Stany Zjednoczone) [29] oraz Prof. Dereka Macellan'a z Uniwersytetu w Londynie (Wielka Brytania) [28].

Zastrzeżenia dotyczące reutilizacji deuteru oraz zaproponowanie alternatywnego modelu

Pierwsze wątpliwości dotyczące oznaczonej *in vivo* długości życia neutrofilii pojawiły się ze strony grupy badawczej Prof. Peters'a [45], a podstawowe zastrzeżenia dotyczyły możliwości reutilizacji (ponownego wykorzystania) deuteru w obrębie szpiku kostnego, który jest głównym miejscem powstawania, rozwoju

i destrukcji neutrofilii [45]. Zarzut dotyczył braku informacji o dostępności znakowanej deuterem adenozyiny, która mogłaby zostać wbudowana ponownie do nowodzielających się prekursorów neutrofilii.

Ponadto zakwestionowano metodologię zbierania próbek, tylko w kilku punktach czasowych – co 12 dni. Pillay i wsp. (2010) bazowali w swojej pracy na poprzednich badaniach własnych, wykorzystując interwały czasowe, zastosowane w doświadczeniach prowadzonych na limfocytach człowieka. Limfocyty jednak, w przeciwieństwie do neutrofilii, charakteryzują się znacznie dłuższym czasem życia (ponad 100 dni) [49].

Grupę Prof. Peters'a zastanowił ponadto zaobserwowany w 63-cim dniu znakowania nagły wzrost wzbogacenia krwi deuterem, który nie został wyjaśniony przez grupę Prof. Koenderman'a. Poziom deuteru w moczu odpowiadał dawce użytego znacznika, podczas gdy we krwi był nadspodziewanie wysoki. Pillay i wsp. (2010) wprowadzili czynnik amplifikacji c , który miał korygować fakt istnienia wielu atomów wodoru w pojedynczej reszcie deoksyrybozy adenozyiny. Jednak według Tofts i wsp. (2011) stosunek wbudowania deuteru do adenozyiny, w określonej pozycji wodoru, nie może zależeć od liczby i loci atomów wodoru w całej cząsteczce. Dlatego Tofts i wsp. (2011) wysnuli przypuszczenie, że tak wysokie wzbogacenie krwi deuterem może wynikać z faktu, iż reakcje hydrolizy wiązań pomiędzy węglem a wodorem są znacznie szybsze (ok. 7-krotnie), aniżeli pomiędzy węglem a deuterem, co bezpośrednio przekłada się na dłuższy czas przebywania znacznika (^2H) we krwi. Zjawisko to znane jest jako kinetyczny efekt izotopowy [45].

Biorąc poprawkę na powyższe fakty, grupa Prof. Peters'a zaproponowała alternatywny, prostszy model, w którym wykorzystano dane z pracy Pillay i wsp. (2010), ale w obliczeniach naukowcy bazowali jedynie na dwóch, a nie na trzech (tak jak w oryginalnym modelu) parametrach, uzyskując bardzo dobre dopasowanie rozkładu danych (ryc. 3B). Posługując się alternatywnym modelem oszacowano, że całkowita długość życia neutrofilii (suma długości ich życia w szpiku kostnym, we krwi, wraz z czasem opóźnienia przejścia neutrofilii ze szpiku do krwi) wynosi 11.2 dnia [45], co było zgodne z danymi uzyskanymi w oznaczeniach grupy Prof. Koenderman'a [34]. Jednak uzyskana przez grupę Prof. Peters'a długość życia neutrofilii we krwi była nieporównywalnie krótsza, zaniedbywalnie krótka, w stosunku do czasu ich dojrzewania w szpiku kostnym [45]. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono zatem, iż podana w pracy Pillay i wsp. (2010) długość życia neutrofilii we krwi obwodowej jest nieprawdopodobna [45]. Badacze wyrazili jednak przekonanie, że opracowana technika znakowania DNA neutrofilii deuterem i model matematyczny grupy Koenderman'a, mogą być zastosowane do oceny długości życia neutrofilii sumarycznie, w szpiku oraz we krwi [45]. Istotnie, uzyskana przez Pillay i wsp. (2010) średnia wartość 11.2 dnia odpowiadała uzyskanej w modelu alternatywnym wartości oraz korespondowała również z opublikowanymi dotychczas danymi o czasie dojrzewania neutrofilii w szpiku kostnym [11].

Grupa Koenderman'a ustosunkowała się do zastrzeżeń przedstawionych powyżej. Po pierwsze zgodzono się, że istnieje korelacja uproszczonego modelu grupy Peters'a [35, 45,] z wynikami własnymi, ale z zastrzeżeniem, że odnosi się tylko do sytuacji, w której znakowane neutrofile opuszczają szpik ok. 11 dnia po ostatnim podziale, w innym przypadku wyniki nie będą porównywalne [35]. Pillay i wsp. (2011) za argument uprawniający ich do odparcia tego zarzutu, wskazali badania przeprowadzone *in vivo*, które dowodzą, iż neutrofile opuszczają szpik o wiele szybciej, nawet w 6 dniu po ostatnim podziale [14, 30]. Także we własnych oznaczeniach autorzy wykazali obecność znakowanych neutrofilów we krwi już w 7 dniu pomiaru, a najlepsze dopasowanie rozkładu danych w oryginalnej pracy sugeruje, że czas opóźnienia przejścia neutrofilów do krwi, po ostatnim podziale w szpiku, wynosi 6 dni. W związku z powyższym grupa Koenderman'a odrzuciła zastrzeżenia Tofts i wsp. (2011) w tym zakresie.

W kwestii wysokiego poziomu deuteru obecnego w DNA neutrofilów we krwi, w dniu 63, grupa Koenderman'a wyjaśniła, iż istotnie metoda, którą się posłużyli opiera się na oznaczeniu wzbogacenia deuterem pochodnych deoksyrybozy (dR), której cząsteczka zawiera wiele atomów wodoru w różnych lokalizacjach, a podstawieniu przez znacznik ulega wodór niezależnie od jego położenia w cząsteczce. Ponieważ uzyskano słabe wzbogacenie znacznikiem całkowitej wody w organizmie, wskazywało to, że podwójne znakowanie (podstawienie więcej niż jednego atomu wodoru przez deuter) w obrębie pojedynczej dR w rzeczywistości zachodzi rzadko [35]. Zaproponowane przez Tofts i wsp. (2011) wyjaśnienie dotyczące kinetycznego efektu izotopowego nie zostało skomentowane przez grupę Prof. Koenderman'a.

Zastrzeżenia dotyczące czasu przebywania neutrofilów w szpiku kostnym i we krwi oraz nowy „wielopredziałowy” model

Kolejne zastrzeżenia do modelu matematycznego grupy Prof. Koenderman'a wystosowała grupa badawcza Prof. Davida Dale'a [29], która również odniosła się do interpretacji danych o czasie półtrwania neutrofilów człowieka we krwi, tj. 3.75 dni. Według nich błędnym było zastosowanie jednego modelu do analizy różnych etapów życia neutrofilów (tj. dojrzewania w szpiku kostnym, a następnie przejścia i obecności we krwi obwodowej). Badacze zaproponowali nowy model tzw. „wielopredziałowy” (ang. *multicompartment model*), bazujący na założeniu, iż prekursorzy neutrofilów w szpiku kostnym dzieląc się wbudowują znacznik, a następnie dojrzewają i przechodzą do krążenia, gdzie pozostają wyznakowane. W zaproponowanym modelu wykorzystano dane z pracy Dancey'a i wsp. (1976) posługujących się znacznikiem $^3\text{HTdr}$ (tymidyna znakowana trytem) [14].

Model „wielopredziałowy” Li i wsp. (2011) różnił się od modelu „jednopredziałowego” Pillay i wsp. (2010) głównym założeniem: wyznakowane neutrofile przebywają przez pewien (dłuższy) czas w szpiku kostnym zanim przejdą do krwi.

W pracy grupy Prof. Dale'a przedstawiono dwa możliwe rozwiązania, a swoje analizy badacze opracowali za pomocą specjalistycznego oprogramowania SAAM II, które służy modelowaniu, symulacji oraz statystycznej kalibracji modeli przedziałowych w systemach biologicznych, metabolicznych i farmaceutycznych (<https://tegvirginia.com/solutions/saam-ii/>).

W pierwszym wariancie opracowanym przez Li et al. (2011), okres półtrwania neutrofili był zgodny z wynikami Pillay i wsp. (2011) i wynosił 3,5 dnia. W tym układzie aktywność (liczba) znakowanych neutrofili w szpiku wzrastała wcześniej niż we krwi, ale we krwi spowalniała. W drugim modelu, czynnikiem opóźniającym przejście neutrofili do krwi była proliferacja i dojrzewanie tych komórek w szpiku kostnym, a okres ich półtrwania w krążeniu wynosił 7,5 h, co było zgodne z dotychczasowymi danymi. Ten wariant wskazywał raczej na rozciągnięte w czasie dojrzewanie znakowanych neutrofili w szpiku kostnym, niż na ich dłuższy, niż dotychczas sądzono, okres półtrwania we krwi. Li et al. (2011) zasugerowali, że bardzo podobna kinetyka wbudowywania ^2H w DNA neutrofili w szpiku i we krwi, zaprezentowana w pracy grupy Koenderman'a, odzwierciedla w istocie kinetykę tych komórek w szpiku kostnym.

Grupa Prof. Koenderman'a zgodziła się, że nie można wykluczyć poprawności rozwiązania przedstawionego przez Li i wsp. (2011), zgodnie z którym wolniejsza produkcja granulocytów obojętnochłonnych w szpiku kostnym jest czynnikiem ograniczającym przebywanie neutrofili we krwi [29, 35]. W takim przypadku, znacznik pojawiałby się we krwi z opóźnieniem, co zaburzałoby interpretację wyników uzyskanych z zastosowaniem opracowanego modelu. Badacze przyznali jednak, że aby rozstrzygnąć słuszność dwóch rozwiązań zaproponowanych przez Li i wsp. (2011), należałoby dokonać pomiaru kinetyki wbudowywania deuteru w DNA ludzkich neutrofili w szpiku kostnym *in vivo*, a nie tylko we krwi, czego sami nie przeprowadzili w swoich oznaczeniach [35].

Sami autorzy przyznali dodatkowo po latach [42], że założenie homogenności populacji neutrofili nie było poprawne i nie uwzględniało istnienia puli neutrofili, która natychmiast pod wpływem aktywacji (np. w przebiegu sepsy, traumy, bądź też ćwiczeń fizycznych) jest uwalniana do krążenia [42]. Część tych komórek (do 50 %) pochodzi z „puli zapasowej” lub „puli marginalnej” (ang. *marginal pool*) ulokowanej w naczyniach krwionośnych wątroby, płuc, śledziony, gdzie neutrofile pozostają w kontakcie ze śródbłonkiem naczyniowym [27], ale pozostałe komórki są uwalniane do krwi bezpośrednio ze szpiku kostnego. Neutrofile te często nie osiągnęły jeszcze pełnej dojrzałości i przykładowo granulocyty obojętnochłonne o pałeczkowatym jądrze są zwykle obserwowane we krwi w trakcie sepsy [31]. Potwierdzają to też badania pokazujące, iż lipopolisacharyd (LPS) czy kortykosteroidy nie tylko zwiększają liczbę znakowanych neutrofili we krwi, ale także obniżają średnią ilość znacznika przypadającego na komórkę [42]. To potwierdza pogląd, iż nie tylko „pula zapasowa” jest mobilizowana do krążenia, ale także neutrofile, w większości niedojrzałe, są rekrutowane ze szpiku kostnego.

Zastrzeżenia dotyczące proporcji neutrofili we krwi do ich prekursorów w szpiku

Badania nad oszacowaniem czasu przebywania neutrofili w krążeniu trwają do dziś. W pracy opublikowanej w 2016 roku ponownie zakwestionowano model matematyczny przedstawiony przez grupę badawczą Prof. Koenderman'a. Badania te zostały przeprowadzone pod kierownictwem Prof. Macallan'a, a uzyskane wyniki opracowano przy zastosowaniu nowego modelu mechanistycznego (ryc. 3C) [28]. W pierwszej kolejności, za pomocą znakowania *in vivo* glukozą sprzężoną z deuterem ([6,6- $^2\text{H}_2$]-glukoza), oszacowano stosunek neutrofili powstających w szpiku kostnym, do komórek obecnych we krwi. Dodatkowo przeprowadzono znakowanie neutrofili ciężką wodą, aby ostatecznie rozstrzygnąć słuszność danych przedstawionych przez Pillay'a i wsp. (2010). Do badań zaproszono 9 zdrowych ochotników – do eksperymentów z użyciem znakowanej glukozy, oraz dodatkowo 4 ochotników – do badań z wykorzystaniem wody ciężkiej. W przypadku znakowania [6,6- $^2\text{H}_2$]-glukozą, roztwór znacznika podawano doustnie ochotnikom w małych porcjach w ciągu 10 godzin, w odstępach półgodzinnych. Kolejno, protokół podawania znaczników został zmodyfikowany poprzez zredukowanie zawartości znacznika do 20 g oraz czasu podawania do 4 dni. W wybranych punktach czasowych po etapie znakowania, izolowano neutrofile z krwi, pozyskiwano ich DNA, a następnie, przy użyciu metody chromatografii sprzężonej ze spektrometrią mas, mierzono poziom wzbogacenia materiału genetycznego deuterem. Znakowanie wodą ciężką przeprowadzono podając ochotnikom 70 % roztwór $^2\text{H}_2\text{O}$, trzy razy dziennie po 50 ml, przez okres jednego tygodnia, a następnie dwa razy dziennie (po 50 ml) przez kolejne 6 tygodni (całkowity czas znakowania wyniósł zatem 7 tygodni, a całkowita ilość podanej wody ciężkiej w tym czasie wyniosła 5250 ml/osobę). Podczas, i po, znakowaniu wodą ciężką zebrano próbki śliny, celem pomiaru zawartości deuteru w całkowitej puli wody obecnej w organizmie. Populację neutrofili wyznakowaną wodą ciężką wyizolowano, a następnie pozyskano DNA celem ilościowego oznaczenia stężenia znacznika wbudowanego do materiału genetycznego [28].

Model Lahoz-Beneytez i wsp. (2011) różnił się od modelu Pillay i wsp. (2010) przede wszystkim wprowadzeniem wskaźnika R, który odzwierciedlał stosunek neutrofili obecnych we krwi do prekursorów obecnych w puli mitotycznej szpiku kostnego. Model opracowany przez grupę badawczą Prof. Macallan'a bazował na następujących założeniach:

- (i) znacznik wbudowuje się do dzielących się neutrofili w szpiku kostnym, więc będzie obserwowany w dojrzałych formach komórek krążących we krwi,
- (ii) obserwuje się opóźnienie pojawienia się znacznika we krwi wynikające z dojrzewania metamielocytów w szpiku kostnym, po ostatnim podziale mitotycznym.

Szczegółowe równania wyprowadzone w modelu przedstawiono na rycinie 3C.

Badacze przeprowadzili dodatkowo procedurę dopasowania uzyskanych danych eksperymentalnych do opracowanego modelu za pomocą algorytmu FME (ang. *Flexible Model Environment*). Błędy standardowe oszacowano przy użyciu

metody asymptotycznej kowariancji macierzy [28]. Całkowita długość życia została zdefiniowana przez autorów jako odwrotność wskaźnika wyjścia neutrofilii z krążenia ($1/z$), natomiast czas półtrwania oszacowano na podstawie wzoru $t_{1/2} = \ln(2)/z$ [35]. Ten drugi parametr nie różnił się więc od założeń grupy Koenderman'a.

Zebrane wyniki z oznaczeń przy użyciu glukozy wskazały, iż u człowieka średni czas przejścia neutrofilii ze szpiku kostnego do krwi równy jest 5.8 dnia, a średni czas półtrwania 19 h we krwi (co równa się całkowitej długości życia w krążeniu szacowanej na 1.05 dnia). Oznaczenia wykonane przy użyciu wody ciężkiej pozwoliły na oszacowanie czasu półtrwania neutrofilii we krwi na 1.11 dnia. Otrzymane wartości dla oznaczeń z $^2\text{H}_2\text{O}$ były wyższe w porównaniu do tych z użyciem $[6,6\text{-}^2\text{H}_2]\text{-glukozy}$, lecz autorzy wysnuli przypuszczenie, że może to być związane z trudnościami, które napotkali przy oszacowaniu czasu przejścia neutrofilii z puli postmitotycznej. Uzyskano bowiem znaczące różnice między osobnikami, a więc dane obarczone były dużymi błędami standardowymi. Aby znormalizować dane, badacze powtórnie przeanalizowali wyniki oznaczeń z użyciem ciężkiej wody, bazując na wartości 5.7 dnia jako czasie przejścia neutrofilii ze szpiku. Wynikało to z ich własnych oznaczeń oraz istniejących już danych literaturowych. Ponowna analiza pozwoliła na oszacowanie średniego czasu półtrwania ludzkich neutrofilii na 0.77 dnia, zgodnej z wynikiem otrzymanym z użyciem $[6,6\text{-}^2\text{H}_2]\text{-glukozy}$ [28].

Praca Lahoz-Beneytez i wsp. (2016) podważyła zatem ostatecznie wyniki otrzymane przez Prof. Koenderman'a. Wydaje się, że główną przyczyną otrzymania tak wysokich wartości czasu życia neutrofilii podanych przez Pillay i wsp. (2010), opisanych w „1-przedziałowym” modelu, wynikał z błędnie przyjętej hipotezy o niewielkiej populacji neutrofilii proliferujących w szpiku kostnym, w stosunku do liczby neutrofilii obecnych we krwi. Było to sprzeczne z obecną wiedzą na temat wielkości puli granulocytów obojętnochłonnych w szpiku kostnym oraz we krwi obwodowej [28].

Grupa Prof. Macallan'a w swojej pracy podtrzymała ponadto powszechnie już przyjęty dogmat, iż manipulacje dokonywane *ex vivo* oraz użycie znaczników toksycznych, tj. diizopropylfluorofosforanu, 3-bromo-2'-deoksyurydyny oraz tymidyny znakowanej trytem, wpływają na żywotność komórek, ich czas życia oraz wzrost ich sekwestracji w narządach (pula marginalna). Warto jednak zaznaczyć, że badacze przestrzegają, iż opracowany przez nich model odzwierciedla warunki panujące w stanie fizjologicznym. W przypadku braku homeostazy, np. w czasie sepsy lub traumy, parametry te mogą być inne [28].

Prześledzenie powyższych badań i dyskusji naukowej jest tyleż fascynujące co nasuwa również istotne wnioski. Pozornie, dane na temat długości życia neutrofilii w krążeniu nie uległy bowiem zasadniczej zmianie, obecnie dopuszcza się, że neutrofile żyją dłużej niż uważano przed publikacją Pillay i wsp. (2010), ale czas ten powinno się dalej wyrażać raczej w godzinach niż dniach. Dane dla neutrofilii człowieka to obecnie 19 godzin jako czas półtrwania w krążeniu *versus* 3.8 dnia

zaproponowany przez grupę Koenderman'a i do 10 godzin według stanu wiedzy sprzed 2010 roku. Wnioski dotyczą kompleksowości metod badawczych i trudności w badaniu procesów zachodzących *in vivo*, zwłaszcza w przypadku gdy badane komórki przemieszczają się pomiędzy różnymi przedziałami w organizmie, np. na osi szpik kostny – krew. Pokazują także jak ważne jest publikowanie „wyników negatywnych” (pokazanie innym grupom badawczym, że dany parametr został już zbadany, ale nie zmienił zasadniczo dotychczasowej wiedzy), a przede wszystkim jak ważna jest konstruktywna, krytyczna lektura prac badawczych. Prześledźmy jeszcze losy neutrofili po opuszczeniu krążenia oraz zweryfikujmy informacje dotyczące długości ich życia poza krwią.

DŁUGOŚĆ ŻYCIA NEUTROFILI W TKANKACH

W fizjologicznych warunkach neutrofile mogą rezydować w szpiku kostnym, śledzionie, wątrobie oraz w płucach [24, 26]. Postuluje się udział tych narządów w tworzeniu puli zapasowej, która stale „patroluje” wspomniane organy, w poszukiwaniu uszkodzenia tkanek bądź patogenów [24]. Przykładowo, w płucach czas przebywania neutrofili jest znacznie dłuższy niż średni czas przejścia tych komórek przez sieć naczyń krwionośnych. Badania bazujące na obserwacjach tego zjawiska w czasie rzeczywistym (mikroskopia *in vivo*) wskazały na obecność neutrofili przebywających w płucach w warunkach homeostazy [26]. Co więcej wykazano, iż wykazują one znaczącą ruchliwość, a w odpowiedzi na infekcję ich ruchliwość dodatkowo wzrasta i komórki te tworzą charakterystyczne skupiska [26]. Neutrofile wykryto ponadto w zdrowej wątrobie, ale w tym narządzie pozostawały nieruchome, nie wykazano u nich cech komórek aktywnie patrolujących tkanki [23].

Dzięki zastosowaniu techniki mikroskopii wielofotonowej wykazano także, że w warunkach homeostazy neutrofile ulegają retencji w kapilarach kłębuszków nerkowych myszy [15]. Wykazano, że ponad 50 % zalegających neutrofili toczy się w obrębie kłębuszków i co pewien czas zmienia kierunek migracji, co wskazuje, iż przemieszczanie się neutrofili jest niezależne od kierunku przepływu krwi w naczyniach. Dodatkowo wykazano, że proces zapalny wydłuża czas przebywania neutrofili w tym narządzie [15].

Zwiększona liczba neutrofili występuje ponadto w tkance tłuszczowej w stanie otyłości, gdzie obserwuje się napływ tych komórek i gromadzenie się ich wokół, a nawet przyleganie do adipocytów [16]. W mysim modelu otyłości dietozależnej, obserwowano napływ neutrofili już w trzecim dniu od rozpoczęcia karmienia paszą wysokotłuszczową (ang. *High Fat Diet*, HFD, 60% energii z tłuszczów), a istotny wzrost zawartości neutrofili w tej tkance utrzymywał się na stałym wysokim poziomie, do 90 dnia diety [43].

Osobnym zagadnieniem jest wydłużony czas życia neutrofili w tkankach objętych zapaleniem [26, 30]. W trakcie stanu zapalnego, neutrofile ulegają zaktywowaniu, przez co długość ich życia może ulec wielokrotnemu wydłużeniu zapewniając obecność pobudzonych neutrofili w miejscu zapalenia [13, 40]. Wynika to z kontaktu neutrofili z mediatorami zapalenia, cytokinami, czynnikami wzrostu, a także składnikami bakterii, które bezpośrednio inicjują proces zapalny. Wymienić tu można odpowiednio takie czynniki jak TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ , GM-CSF, G-SCF oraz molekularne wzorce związane z patogenami PAMP (ang. *Pathogen Associated Molecular Patterns*) [40].

Przeprowadzając serię doświadczeń w warunkach *in vitro*, w trakcie których neutrofile człowieka poddano działaniu czynników będących klasycznymi cytokinami zapalnymi (IL-1 β , TNF- α [24]), cytokinami zaangażowanymi w modulowanie funkcji granulocytów (np. G-CSF [37]) oraz składnikami bakterii gram ujemnych i dodatnich, wykazano, że mają one wpływ na długość życia neutrofili. Przykładowo, żywotność neutrofili wydłużała się po stymulacji TNF- α , a zwłaszcza IL-1 β , a wynikało to z zahamowania apoptozy [13]. Jednak nie wszystkie cząsteczki immunostymulujące powodują taki efekt. Nie wykazano go bowiem w przypadku stymulacji neutrofili np. M-CSF czy IL-8 [13].

Z kolei badając czas życia neutrofili w teście zabliźniania sterylnego uszkodzenia skóry wykazano, że w przypadku zwierząt, których rana została dodatkowo zainfekowana gram dodatnią bakterią *Staphylococcus aureus*, długość życia neutrofili, które napłynęły do miejsca zranienia została przedłużona i utrzymywała się na stałym poziomie, podczas gdy w grupie zwierząt kontrolnych sukcesywnie spadała [19].

Przedłużony czas życia neutrofili w tkankach objętych zapaleniem może gwarantować tym komórkom szerszy wachlarz funkcji, związanych na przykład z udziałem w wygaszaniu reakcji zapalnej czy kształtowaniu nabytej reakcji odpornościowej. Należy jednak pamiętać, że przedłużona obecność i pełna funkcjonalność neutrofili w tkankach często prowadzi także do ich uszkodzeń [24].

ZNACZENIE DŁUGOŚCI ŻYCIA NEUTROFILI DLA FUNKCJI OBRONNYCH ORGANIZMU

Długość życia każdej komórki jest ściśle kontrolowana. W przypadku wielu typów komórek organizmu (np. komórek nabłonka czy śródbłonka), czas ten jest z góry zaprogramowany, a po jego upływie komórki te giną apoptotycznie. Jednak w przypadku niektórych typów komórek, długość ich życia może być regulowana także przez środowisko, a w przypadku komórek przemieszczających się po organizmie, także przez typ tkanki, w której się znajdują [24]. W przypadku neutrofili, najlepiej opisanym czynnikiem transkrypcyjnym kontrolującym wejście, lub nie, na

drogę apoptozy jest antygen jądrowy komórek proliferujących PCNA (ang. *Proliferating Cell Nuclear Antigen*) [50]. W neutrofilach czynnik ten znajduje się wyjątkowo w cytozolu, dokąd przemieszcza się na końcowych etapach granulocytopeozy, i reguluje wejście neutrofilów na szlak apoptotyczny. Wynika to z faktu, że PCNA wiąże się z pro-kaspazami uniemożliwiając ich aktywację [50]. Obecnie prowadzone są badania nad zastosowaniem różnych form PCNA do kontroli czasu życia neutrofilów w kontekście transfuzji tych komórek w celach klinicznych. Okazuje się, że czas życia neutrofilów można istotnie wydłużyć także odpowiednio dobranym poziomem glukozy, a przede wszystkim anoksją (niedotlenieniem) [33].

Starzejące się, apoptotyczne neutrofile są usuwane w szpiku kostnym, wątrobie i śledzionie [24, 36, 39]. W przypadku szpiku kostnego, neutrofile są tam rekrutowane na skutek zwiększającej się ekspresji receptora chemokinowego CXCR4 na ich powierzchni. Ligandem dla tego receptora jest SPF-1 (CXCL12), chemokina uwalniana przez szpik kostny w sposób ciągły [52]. Okazuje się, że w czasie sepsy starzejące się neutrofile pierwsze napływają do ogniska zapalnego i bardziej efektywnie niż dojrzałe neutrofile fagocytują patogeny [46]. Wydaje się, że należy ten fakt interpretować jako wykorzystanie przez układ odpornościowy „doświadczonych” neutrofilów jako pierwszej linii obrony [21]. Starzejące się neutrofile mają także większą zdolność do wyrzutu NET [52]. Jednak nadmierna reakcja zapalna może także przyczynić się do uszkodzenia własnych tkanek [21].

Podobne zjawisko zaobserwowano także w przebiegu astmy, w której dochodzi do nadmiernej akumulacji neutrofilów w błonie śluzowej dróg oddechowych. Wśród napływających neutrofilów dominują bowiem formy dojrzałe, ale obecne są także neutrofile niedojrzałe o pałeczkowatym jądrze oraz neutrofile o hypersegmentowanym jądrze [8]. Ten ostatni fenotyp jest charakterystyczny dla bardzo dojrzałych, starzejących się neutrofilów.

PODSUMOWANIE

Przez wiele dekad, neutrofile były uważane za „prostych żołnierzy pierwszej linii obrony organizmu”. Pogląd ten bazował na obowiązującej wiedzy zgodnie, z którą komórki te żyły krótko, ale intensywnie, czy to w krążeniu czy w tkankach po zaistnieniu reakcji zapalnej, nie wykazywały także żadnego zróżnicowania na populacje podobne do tych istniejących w przypadku limfocytów (T vs. B, Th vs. Tc) czy makrofagów (M1 vs. M2). Dopiero ostatnia dekada przyniosła doniesienia zmieniające nasz pogląd na temat neutrofilów, w tym badania wskazujące na istnienie populacji pro- i przeciw-zapalnych tych komórek, różnych fenotypowo neutrofilów dojrzałych i starzejących się, a wreszcie neutrofilów N1 (anty-nowotworowych, pro-zapalnych) i N2 (pro-nowotworowych, przeciw-zapalnych). Zróżnicowanie oraz

role różnych populacji neutrofili były przedmiotem ważnych prac przeglądowych [np. 30] i zasługują na osobne studium w polskojęzycznej literaturze. W obecnym opracowaniu omówiliśmy najważniejsze doniesienia dotyczące długości życia tych komórek w krążeniu oraz ognisku zapalnym, w tym wszelkie kontrowersje i zmiany poglądów zaangażowanych w badania naukowców. Jeśli chodzi o długość życia neutrofili wiemy obecnie na pewno, że w miejscu zapalenia może ona być znacząco wydłużona poprzez czynniki pro-zapalne, ale także, że czas ich przebywania we krwi jest dłuższy niż dotychczas sądzono. Nie jest to jednak różnica tak znacząca jak wskazywały na to pierwsze doniesienia. Fakt, że starzejące się neutrofile odgrywają tak istotną rolę w przebiegu reakcji zapalnych wskazuje na dużą wydajność odpowiedzi wrodzonej oraz zdolność do adaptacji w przypadku zagrożenia. Biorąc pod uwagę doniesienia o zaangażowaniu neutrofili także w odpowiedź nabytą, wydaje się że badania tych komórek przeżywają obecnie swój renesans.

PODZIĘKOWANIA

Praca powstała dzięki wsparciu finansowemu Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu 2014/15/B/NZ6/02519 (Opus 8; EK) oraz grantom K/DSC/003948 (IC) i K/DSC/003974 (MS)

LITERATURA

- [1] AMULIC B, CAZALET C, HAYES GL., METZLER KD, ZYCHILINSKY A. Neutrophil function: from mechanism to disease. *Annu Rev Immunol* 2012; **30**: 459-489.
- [2] ANDERSON KG, MAYER-BARBER K, SUNG H, BEURA L, JAMES BR, TAYLOR J, QUNAJ L, GRIFFITH TS, VEZYS V, BARBER DL, MASOPUST D. Intravascular staining for discrimination of vascular and tissue leukocytes. *Nat Protoc* 2014; **9**: 209-222.
- [3] BIEDRON R, KONOPINSKI MK, MARCINKIEWICZ J, JOZEFOWSKI S. Oxidation by neutrophil-derived HOCl increases immunogenicity of proteins by converting them into ligands of several endocytic receptors involved in antigen uptake by dendritic cells and macrophages. *PLoS One* **10**: e0123293.
- [4] BJERREGAARD MD, BORREGAARD N, COWLAND JB, JURLANDER J, KLAUSEN P. The in vivo profile of transcription factors during neutrophil differentiation in human bone marrow. *Blood* 2003; **101**: 4322-4332.
- [5] BORREGAARD N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 2010; **33**: 657- 670.
- [6] BORREGAARD N, SORENSEN OE, THEILGAARD-MONCH K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol* 2007; **8**: 340-345.
- [7] BRINKMANN V, REICHARD U, GOOSMANN C, FAULER B, UHLEMANN Y, WEISS DS, WEINRAUCH Y, ZYCHILINSKY A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; **303**: 1532-1535.
- [8] BRUIJNZEEL PL, UDDIN M, KOENDERMAN L. Targeting neutrophilic inflammation in severe neutrophilic asthma: can we target the disease-relevant neutrophil phenotype? *J Leukoc Biol* 2015; **98**:549-556.
- [9] BUCKLEY CD, ROSS EA, MCGETTRICK HM, OSBORNE CE, HAWORTH O, SCHMUTZ C, STONE PC, SALMON M, MATHARU NM, VOHRA RK, NASH GB, RAINGER GE. Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration. *J Leukoc Biol* 2006; **79**: 303-311.

- [10] CAMPANELLI D, DETMERS PA, GABAY JE, NATHAN CF. Azurocidin and homologous serine protease from neutrophils. Differential antimicrobial and proteolytic properties. *J Clin Invest* 1990; **85**: 904-915.
- [11] CARTWRIGHT GE, ATHENS JW, WINTROBE MM. The kinetics of granulopoiesis in normal man. *Blood* 1964; **24**: 780-803.
- [12] CHUNG FM, TSAI JC, CHANG DM, SHIN SJ, LEE YJ. Peripheral total and differential leukocyte count in diabetic nephropathy: the relationship of plasma leptin to leukocytosis. *Diabetes Care* 2005; **28**: 1710-1717.
- [13] COLOTTA F, RE F, POLENTARUTTI N, SOZZANI S, MONTAVANI A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 1992; **8**: 2012-2020.
- [14] DANCEY JT, DEUBELBEISS KA, HARKER LA, FINCH CA. Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest* 1976; **58**: 705-715.
- [15] DEVI S, LI A, WESTHORPE CL, LO CY, ABEYNAIKE LD, SNELGROVE SL, HALL P, OOI JD, SOBEY CG, KITCHING AR, HICKEY MJ. Multiphoton imaging reveals a new leukocyte recruitment paradigm in the glomerulus. *Nat Med* 2013; **19**: 107-112.
- [16] ELGAZAR-CARMON V, RUDICH A, HADAD N, LEVY R. Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *J Lipid Res* 2008; **49**: 1894-903.
- [17] FAURSCHOU M, BORREGAARD N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* 2003; **5**: 1317-1327.
- [18] HÄGER M, BORREGAARD N, COWLAND JB. Neutrophil granules in health and disease. *J Intern Med* 2010; **268**: 25-34.
- [19] KIM M-H, GRANICK JL, KWOK C, WALKER NJ, BORJESSON DL, CURRY F-RE, MILLER LS, SIMON SI. Neutrophil survival and c-kit⁺ -progenitor proliferation in *Staphylococcus aureus*-infected skin wounds promote resolution. *Blood* 2011; **117**: 3343-3352.
- [20] KOLACZKOWSKA E. Zapalenie (ostre) jako reakcja korzystna dla organizmu – historia badań a najnowsze osiągnięcia. *Kosmos* 2007; **56**: 27-38.
- [21] KOLACZKOWSKA E. The older the faster: aged neutrophils in inflammation. *Blood* 2016; **128**: 2280-2282.
- [22] KOLACZKOWSKA E, GRZYBEK W, VAN ROOIJEN N, PICCARD H, PLYTYCZ B, ARNOLD B, OPDENAKKER G. Neutrophil elastase activity compensates for a genetic lack of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in leukocyte infiltration in a model of experimental peritonitis. *J Leukoc Biol* 2009; **85**: 374-381.
- [23] KOLACZKOWSKA E, JENNE CN, SUREWAARD BGJ, THANABALASURIAR A, LEE W-Y, SANZ M-J, MOWEN K, OPDENAKKER G, KUBES P. Molecular mechanism of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature. *Nat Comm* 2015; **6**: 6673.
- [24] KOLACZKOWSKA E, KUBES P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2013; **13**: 159-175.
- [25] KORKMAZ B, HORWITZ MS, JENNE DE, GAUTHIER F. Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. *Pharmacol Rev* 2010; **62**: 726-759.
- [26] KREISEL D, NAVA RG, LI W, ZINSELMAYER BII, WANG B, LAI J, PLESS R, GELMAN AE, KRUPNICK AS, MILLER MJ. In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 18073-18078.
- [27] KRUGER P, SAFFARZADEH M, WEBER AN, RIEBER N, RADSACK M, VON BERNUTH H, BENARAF A, ROOS D, SKOKOWA J, HART D. Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog* 2015; **11**: e1004651.
- [28] LAHOZ-BENEYTEZ J, ELEMANS M, ZHANG Y, AHMED R, SALAM A, BLOCK M, NIEDERALT C, ASQUITH B, MACALLAN D. Human neutrophil kinetics: modeling of stable isotope labeling data supports short blood neutrophil half-lives. *Blood* 2016; **127**: 3431-3438.
- [29] LI KW, TURNER SM, EMSON CL, HELLERSTEIN MK, DALE DC. Deuterium and neutrophil kinetics. *Blood* 2011; **117**: 6052-6053.
- [30] MACALLAN DC, FULLERTON CA, NEESE RA, HADDOCK K, PARK SS, HELLERSTEIN MK. Measurement of cell proliferation by labeling of DNA with stable isotope-labeled glucose: studies in vitro, in animals, and in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 708-713.

- [31] MARE TA, TREACHER DF, SHANKAR-HARI M, BEALE R, LEWIS SM, CHAMBERS DJ, BROWN KA. The diagnostic and prognostic significance of monitoring blood levels of immature neutrophils in patients with systemic inflammation. *Crit Care* 2015; **19**: 57.
- [32] MAUER AM, ATHENS JW, ASHENBRUCKER H, CARTWRIGHT GE, WINTROBE MM. Leukokinetic studies. II. A method for labeling granulocytes in vitro with radioactive diisopropylfluorophosphate (Dfp). *J Clin Invest* 1960; **39**:1481-1486.
- [33] MONCEAUX V, CHICHE-LAPIERRE C, CHAPUT C, WITKO-SARSAT V, PREVOST MC, TAYLOR CT, UNGEHEUER MN, SANSONETTI PJ, MARTEYN BS. Anoxia and glucose supplementation preserve neutrophil viability and function. *Blood* 2016; **128**: 993-1002.
- [34] PILLAY J, DEN BRABER I, VRISEKOOP N, KWAST LM, DE BOER RJ, BORGHANS JAM, TESSELAAR K, KOENDERMAN L. In vivo labeling with $^3\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 2010; **116**: 625-627.
- [35] PILLAY J, DEN BRABER I, VRISEKOOP N, KWAST LM, DE BOER RJ, BORGHANS JA, TESSELAAR K, KOENDERMAN L. Response: The in vivo half-life of human neutrophils. *Blood* 2011; **117**: 6053-6054.
- [36] RANKIN SM. The bone marrow: a site of neutrophil clearance. *J Leukoc Biol* 2010; **88**: 241-251.
- [37] SEMERAD CL, LIU F, GREGORY AD, STUMPF K, LINK DC. G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity* 2002; **17**: 413-423.
- [38] SEMPLE F, DORIN JR. β -Defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more? *J Innate Immunol* 2012; **4**: 337-348.
- [39] STARK MA, BURCIN TL, HUO Y, LEY K, MORRIS MA, OLSON TS. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* 2005; **22**: 285-294.
- [40] SUMMERS C, RANKIN SM, CONDLIFFE AM, SINGH N, PETERS AM, CHILVERS ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol* 2010; **31**:318-324.
- [41] SURATT BT, YOUNG SK, LIEBER J, NICK JA, HENSON PM, WORTHEN GS. Neutrophil maturation and activation determine anatomic site of clearance from circulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; **281**: L913-921.
- [42] TAK T, TESSELAAR K, PILLAY J, BORGHANS JA, KOENDERMAN L. What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *J Leukoc Biol* 2013; **94**: 595-601.
- [43] TALUKDAR S, OH DY, BANDYOPADHYAY G, LI D, XU J, MCNELIS J, LU M, LI P, YAN Q, ZHU Y, OFRECIO J, LIN M, BRENNER MB, OLEFSKY JM. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat Med* 2012; **18**: 1407-1412.
- [44] TIAN F, YONG H, SONG J, LEI J, YAN X, XIE N, WANG J, ZHAO J, LIANG X, ZHONG D, ZHOU Y, WANG X, LI X. Pulmonary resident neutrophils regulate the production of GM-CSF and alveolar macrophages. *FEBS Journal* 2016; **283**: 1465-1474.
- [45] TOFFS PS, CHEVASSUT T, CUTAJAR M, DOWELL NG, PETERS AM. Doubts concerning the recently reported human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 2011; **117**: 6050-6052.
- [46] UHL B, VADLAU Y, ZUCHTRIEGEL G, NEKOLLA K, SHARAF K, GAERTNER F, MASSBERG S, KROMBACH F, REICHEL CA. Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response. *Blood* 2016; **128**: 2327-2337.
- [47] VEDA P. Why are neutrophils polymorphonuclear? *Eur J Inflamm* 2011; **9**: 85-93.
- [48] VON VIETINGHOFF S, LEY K. Homeostatic regulation of blood neutrophil counts. *J Immunol* 2008; **181**: 5183-5188.
- [49] VRISEKOOP N, DEN BRABER I, DE BOER AB, RUITER AF, ACKERMANS MT, VAN DER CRABBEEN SN, SCHRIJVER EH, SPIERENBURG G, SAUERWEIN HP, HAZENBERG MD, DE BOER RJ, MIEDEMA F, BORGHANS JA, TESSELAAR K. Sparse production but preferential incorporation of recently produced naive T cells in the human peripheral pool. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 6115-6120.
- [50] WITKO-SARSAT V, OHAYON D. Proliferating cell nuclear antigen in neutrophil fate. *Immunol Rev* 2016; **273**: 344-356.
- [51] WRIGHT HL, MOOTS RJ, BUCKNALL RC, EDWARDS SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology* 2010; **49**: 1618-1631.

- [52] ZHANG D, CHEN G, MANWANI D, MORTHA A, XU C, FAITH JJ, BURK RD, KUNISAKI Y, JANG JE, SCHEIERMANN C, MERAD M, FRENETTE PS. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature* 2015; **525**: 528-532.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 19.05.2017

Przyjęto: 10.06.2017

Elżbieta Kołaczowska

Zakład Immunologii Ewolucyjnej, Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych

Uniwersytet Jagielloński

ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków

e-mail: ela.kolaczowska@uj.edu.pl

